

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

Rolando Pérex RODRÍGUEZ

Application No.: New Application 10/605,341

Filed: December 7, 2001

Attorney Dkt. No.: 024518-00003

For: IMMUNOTHERAPEUTIC COMBINATION FOR THE TREATMENT OF
TUMORS THAT OVER-EXPRESS RECEPTORS WITH TYROSINE KINASE
ACTIVITY



CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

April 5, 2002

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign application/s in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

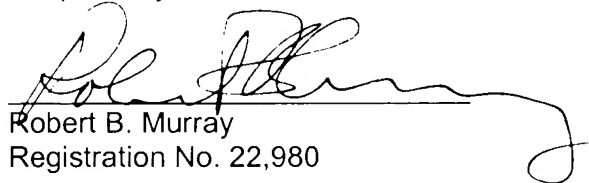
Cuban Patent Application No. 287/2000 filed on December 8, 2000

In support of this claim, certified copy(ies) of said original foreign application/s is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these/this document.

Please charge any fee deficiency or credit any overpayment with respect to this paper to Deposit Account No. 01-2300.

Respectfully submitted,


Robert B. Murray
Registration No. 22,980

Customer No. 004372
ARENT FOX KINTNER PLOTKIN & KAHN, PLLC
1050 Connecticut Avenue, N.W.,
Suite 400
Washington, D.C. 20036-5339
Tel: (202) 857-6000
Fax: (202) 638-4810
RBM:sj



REPÚBLICA DE CUBA



Lic. Emilia Lara Díaz, Vice-Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número doscientos ochenta y siete del año dos mil del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **COMBINACIÓN INMUNOTERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES QUE SOBRE-EXPRESAN RECEPTORES CON ACTIVIDAD QUINASA EN RESIDUOS DE TIROSINA**, con fecha ocho de diciembre de dos mil, a las dos horas pasado meridiano, por Josefa Lombardero Valladares, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación de CENTRO DE INMUNOLOGÍA MOLECULAR, cuya invención fue creada por Rolando Pérez Rodríguez; Gisela María González Marinello; Tania Crombet Ramos e Irene Beausoleil Delgado.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que el Resumen, la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Josefa Lombardero Valladares, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los dieciocho días del mes de diciembre de dos mil uno.



Lic. Emilia Lara Díaz
Vice-Directora General

RESUMEN

Combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores que sobre-expresan receptores con actividad quinasa en residuos de tirosina.

Resumen de la Invención:

La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología y más específicamente con la inmunoterapia del cáncer, particularmente con combinaciones inmunoterapéuticas y métodos de tratamiento para impedir el crecimiento de células tumorales y/o eliminar dichas células.

Los métodos descritos en la presente invención se basan en el bloqueo de receptores con actividad de proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK) y de ligandos para dichos receptores.

Se describen combinaciones inmunoterapéuticas que provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de inmunoterapia activa y/o pasiva contra los mismos y los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-expresan estos receptores. La combinación de inmunoterapia activa y pasiva puede ser simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

Combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores que sobre-expresan receptores con actividad quinasas en residuos de tirosina.

Memoria descriptiva:

El sistema del receptor de EGF (EGF-R) y sus ligandos constituye un complejo molecular cuya interacción regula de forma específica el crecimiento celular y ha sido demostrado su impacto en el crecimiento descontrolado de tumores de origen epitelial. En el proceso de tumorigénesis, la desregulación de los procesos paracrin y autocrinos de activación del EGF-R, esta dada tanto por la sobreproducción de los factores de crecimiento como por la síntesis elevada y/o la mutación de sus receptores.

El EGF-R es una glicoproteína transmembrana de 1186 aminoácidos y 170 kD de peso molecular que se encuentra ampliamente expresada en los tejidos del organismo, y ha sido implicada en varias etapas del desarrollo embriónico. La unión de sus ligandos específicos, EGF o TGF- α , induce la dimerización del receptor así como también la heterodimerización con otros miembros de la familia ErbB, entre ellos el HER-2 (Cohen BD *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271:7620-7629). La unión de los ligandos al receptor dispara una cascada de señales intracelulares (Ullrich A and Schlessinger J (1990) *Cell* 61:203-212) que conducen al crecimiento y diferenciación de las células. La sobreexpresión de este receptor en algunos tipos de neoplasias, fundamentalmente de origen epitelial, ha sido blanco de atención en la inmunoterapia del cáncer. Tal es el caso de tumores de mama, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, próstata y tumores de cabeza y cuello. La presencia de EGF-R ha probado ser una indicación de mal pronóstico en cáncer de mama (Pérez R *et al.* (1984) *Breast Cancer and Treatment* 4:189-193). Aún cuando no se conoce todavía el papel que juega el sistema del EGF-R y sus ligandos en la regulación del crecimiento tumoral, se ha sugerido que la expresión del EGF-R en células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación autocrina que conduce a la proliferación descontrolada de dichas células (Schlessinger J *et al.* (1983) *Crit Rev Biochem* 14 (2):93-111).

Los principales ligandos de este sistema son el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante de tipo alfa (TGF α). Además, existen otros ligandos que pertenecen a la superfamilia del EGF, como son: anfiregulina (AR), criptol (CR1), factor de crecimiento enlazador de heparina, betacelulina, epiregulina, entre otros. El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos con un peso molecular de 6045 Da, el cual resulta mitogénico para células de origen epitelial, ejerciendo su acción fundamentalmente paracrina a partir de su unión al EGF-R. El TGF α es un polipéptido de 50 aminoácidos, capaz de competir con el EGF por la unión al EGF-R. Anticuerpos anti-EGF no son capaces de reconocer al TGF α (Todaro G J *et al.* (1976), *Nature* 264:26-31), por lo que ambos factores de crecimiento son dos entidades inmunológicamente diferentes.

El sistema del EGF-R y sus ligandos ha sido utilizado como blanco de inmunoterapia pasiva (IP), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (AMC) contra el EGF-R, en forma nativa, asociados a drogas, toxinas, o isótopos radiactivos (Vollmar AM *et al.* (1987) *J Cell Physiol* 131:418-425) en la IP de tumores con alta expresión de este receptor. Estos anticuerpos han sido seleccionados por su capacidad de inhibir la unión del EGF a su receptor (anticuerpos neutralizantes). Varios ensayos clínicos con AMC se están llevando a cabo y algunos han mostrado resultados promisorios como es el caso del ensayo clínico con el AMC C225 en cáncer de mama, de células pancreáticas y de células renales en fase II y cabeza-cuello en fase III (Mendelsohn J *et al.* (1999) American Society of Clinical Oncology Meeting). Otro ensayo clínico de Fase II con buenos resultados es el ensayo efectuado con el AMC IOR-R3 en tumores de pulmón (Crombet T *et al.* (2000) *Cancer Biotherapy and Biopharmaceutical*, manuscrito aceptado).

La inmunoterapia pasiva con el Anticuerpo Monoclonal IOR-R3 (EP586002B1), específico contra el EGF-R, ha demostrado que la unión específica del IOR-R3 al receptor inhibe la unión del EGF al mismo, e inhibe la autofosforilación del Receptor, dependiente de EGF. A su vez, la inmunoterapia pasiva con IOR-R3 inhibió el crecimiento de células tumorales humanas en ratones desnudos, y ha disminuido la velocidad de crecimiento del tumor de algunos pacientes en ensayo clínico.

Este sistema también ha sido blanco de inmunoterapia activa específica de cáncer. Un ejemplo de ello lo constituye el uso de una vacuna que contiene uno de los principales ligandos del EGF-R, el EGF, acoplado a una proteína transportadora (US 5,894,018). Esta vacuna es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos específica contra el EGF autólogo e inhibir la unión del mismo a su receptor, bloqueando los mecanismos de proliferación desencadenados por esta unión. Estudios preclínicos han mostrado que la inmunización de ratones con EGF autólogo acoplado a una proteína transportadora en adyuvante incrementa la sobrevida de ratones transplantados con el tumor ascítico de Ehrlich (TAE) (González G *et al* (1996), *Vaccine Research* 5(4):233-243; González G *et al* (1997) *Vaccine Research* 6(2):91-100).

Con una vacuna conteniendo EGF humano recombinante se han reportado los resultados de un ensayo clínico Fase I, que demuestran la inmunogenicidad y la no-toxicidad provocada por la vacunación. (González G *et al* (1998), *Annals of Oncology* 9:1-5).

Otro ejemplo de inmunoterapia activa específica de cáncer en este sistema es la composición vacunal que contiene al EGF-R, proteoliposomas derivados del complejo de proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* y los gangliósidos que se asocian específicamente con dichos receptores formando agrupaciones moleculares de membrana (Patente depositada en Cuba, fecha de prioridad 06.12.00). Así mismo han sido desarrolladas vacunas que contienen otro de los ligandos del EGF-R, como TGF, solo o combinado con el EGF y acoplados a una proteína transportadora (Patente Solicitada en Cuba, fecha de prioridad 06.12.00).

En la presente invención se propone la utilización de inmunoterapias combinadas, dirigidas tanto contra el receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (RTK) como contra sus ligandos, con el objetivo de potenciar el efecto observado al aplicar de manera independiente las diferentes formas de inmunoterapia descritas en el estado del arte, dirigidas solo contra alguno de los componentes del sistema receptor/ligando. Esta potenciación se justifica por el bloqueo conjunto de ambos, ligandos y receptor, en un método de tratamiento que incluya ambos principios.

Combinación inmunoterapéutica para el tratamiento de tumores que sobre-expresan receptores con actividad quinasa en residuos de tirosina.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención está relacionada con combinaciones inmunoterapéuticas y métodos de tratamiento para impedir el crecimiento de células tumorales y para eliminar dichas células, basada en el bloqueo de receptores RTK y de sus ligandos. Este bloqueo puede lograrse, entre otras aproximaciones, con la combinación, tanto simultánea como secuencial de inmunoterapias activas (vacunas terapéuticas) y/o pasivas (Anticuerpos Monoclonales) dirigidas a factores de crecimiento (i.e. EGF, TGF α) y sus receptores (i.e. EGF-R).

El bloqueo de los factores de crecimiento o de sus receptores provoca un efecto de detención de la proliferación celular. En esta invención damos a conocer como el bloqueo simultáneo tanto de ligandos como de receptores potencia el efecto inhibitorio sobre dicha proliferación celular. Este concepto terapéutico es de gran importancia en el tratamiento de tumores malignos, los cuales tienen como propiedad fundamental un incremento en la velocidad de proliferación celular.

Se describen combinaciones inmunoterapéuticas que provocan el bloqueo de receptores RTK y/o sus ligandos, mediante la combinación de inmunoterapia activa y/o pasiva contra los mismos.

Los procedimientos referidos pueden ser aplicados a pacientes en diferentes estadios clínicos de tumores de origen epitelial que sobre-expresan el EFG-R.

La combinación de inmunoterapia activa y pasiva puede ser simultánea o secuencial en dependencia de si el procedimiento terapéutico va a ser utilizado en pacientes con enfermedad avanzada o como terapia adyuvante.

En casos de enfermedad avanzada la combinación terapéutica propuesta es la inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, en combinación con la terapia onco-específica de elección, como terapia de ataque; seguido por tratamiento de inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del efecto terapéutico.

En casos de terapia adyuvante las combinaciones terapéuticas propuestas son o el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor RTK y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, o la combinación donde el tratamiento de inmunoterapia pasiva con Anticuerpos Monoclonales (AMC) que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina y/o AMC que reconozcan a ligandos de dicho receptor, como terapia de ataque; es seguido por el tratamiento simultáneo de inmunoterapia activa con vacunas dirigidas a ligandos de dicho receptor y/o al propio receptor, para lograr respuestas de mantenimiento del efecto terapéutico.

PROCEDIMIENTO 1: Combinación inmunoterapéutica que incluye inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y/o a ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), seguida por inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes con tumores epiteliales en estadios avanzados.

Se administrará a pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales puede ser aplicable alguna otra forma de terapia onco-específica.

Se utilizará primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores. Dicha inmunoterapia pasiva puede administrarse combinada al tratamiento onco-específico de elección.

Posteriormente se aplicará un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento de mantenimiento para lograr mayores períodos de estabilización de la enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango entre 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R y que tengan la propiedad de inhibir dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre cada dosis que oscilará entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses, en combinación con la terapia onco-específica de elección. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de inmunización con vacunas dirigidas al EGF-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGF α), unido a una proteína que funcione como transportadora (i.e. la proteína recombinante P64k de *Neisseria Meningitidis*) y administrado en un adyuvante, que pudiera ser alúmina (entre 1 y 2 mg/ dosis), Montanide ISA 51 (entre 0.6 y 1.2 ml por dosis) u otro. Cada dosis contiene entre 50 y 800 μ g del principio activo (receptor o ligando) unido a la proteína transportadora, en un volumen final de entre 0.6 y 5 mls. El esquema a utilizar es de entre 5 y 8 inmunizaciones iniciales para inducción de respuesta, con frecuencia que pudiera ser desde semanal hasta quincenal. Las inmunizaciones pueden estar precedidas de dosis de ciclofosfamida que pueden encontrarse entre 100 y 500 mg/m² de masa corporal, suministrados entre 2 y 4 días antes de la 1ra inmunización.

Las vacunas pueden estar formuladas en algún otro vehículo vacunal (i.e. liposomas, vacunas ADN, vectores virales)

Las vacunas pueden formularse como productos independientes o dentro de una misma formulación vacunal.

En este período se realizarán extracciones de sangre para medición de parámetros de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el ligando o receptor al que está dirigido la vacuna. Dichas extracciones se realizarán con una frecuencia que puede ser desde semanal a mensual.

Posteriormente, se realizarán reinmunizaciones a la caída de los títulos, con frecuencia que pudiera ser desde mensual a trimestral, por un período de entre 1 y 2 años.

PROCEDIMIENTO 2: Combinación inmunoterapéutica que incluye inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e.egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e.egf, tgf α), conjuntamente con inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, como tratamiento adyuvante

Se administrará al paciente, inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico un tratamiento de inmunoterapia pasiva con AMC que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o a ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α), conjuntamente con un tratamiento activo con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α).

Estos tratamientos, administrados de forma conjunta tendrán un efecto sinérgico, logrando mayores % de regresiones y/o estabilizaciones clínicas de la enfermedad.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis en un rango de 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar de 1 a 24 meses. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Conjuntamente se aplicarán inmunizaciones con vacunas que reconozcan ligandos y/o receptor, con igual esquema que el descrito en el procedimiento #1.

PROCEDIMIENTO 3: Combinación inmunoterapéutica incluye inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan al receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e.egf-r) y/o a ligandos del receptor (i.e.egf, tgf α), seguida por inmunoterapia activa con vacunas dirigidas al receptor y/o ligandos del receptor, a ser aplicadas en pacientes como terapia adyuvante.

Se administrará al paciente inmediatamente después del diagnóstico y/o tratamiento quirúrgico.

Se utilizará primeramente una inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales que reconozcan a un receptor con actividad quinasa en residuos de tirosina (i.e. EGF-R) y que presenten la propiedad de inhibición de dicho receptor y/o con AMC que reconozcan ligandos de dicho receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar una terapia de ataque que tenga como resultado remisión de tumores.

Posteriormente se aplicará un tratamiento de inmunoterapia activa con Vacunas que provoquen una respuesta de anticuerpos bloqueadores del receptor (i.e. EGF-R) y/o de ligandos del receptor (i.e. EGF, TGF α), con el objetivo de efectuar un tratamiento de

mantenimiento para lograr mayores intervalos libres de enfermedad, así como para evitar aparición de nuevos focos metastásicos.

El procedimiento consiste en administrar, a pacientes con tumores de origen epitelial en estadios avanzados, entre 4 y 20 dosis de entre 100 y 400 mg de AMC que reconozcan al EGF-R, que presente la propiedad de inhibición de dicho receptor, y/o de AMC que reconozcan ligandos del mismo, con un tiempo entre dosis de entre 6 y 10 días. Este tratamiento puede durar entre 1 y 24 meses. Se continuará el tratamiento hasta regresión tumoral completa o parcial ó cualquier reacción de toxicidad que requiera la detención del mismo.

Entre 1 y 4 semanas después de terminado el tratamiento con AMC se iniciarán esquemas de inmunización con vacunas dirigidas al EFG-R ó a algún ligando del EGF-R (i.e. EGF, TGF α), siguiendo igual esquema que el detallado en el procedimiento #1.

EJEMPLOS:

Ejemplo 1: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando alúmina como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF (US 5,894,018), usando P64 como proteína transportadora y alúmina como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 1.1 (MMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide metastásico de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:8000, con una cinética como se muestra en la figura 1.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad hasta el mes 15. El paciente fallece a los 23.2 meses después de iniciada la vacunación

Ejemplo 2: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA51 como adyuvante en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Montanide ISA51 como adyuvante, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 2.1 (AMG) fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión, considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se inmunizó con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:32000, con una cinética como se muestra en la figura 2.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 12, en el que se diagnosticó una regresión tumoral por criterios tanto clínicos como radiológicos (figura 3).

En el mes 14 aparece un 2^{do} tumor primario. Fallece de una complicación quirúrgica al mes 18 después de incluido en el ensayo.

Ejemplo 3: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Alúmina como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 3.1, FNR, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de carcinoma epidermoide de pulmón, con enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se trató con una dosis de 100 mg/m² de superficie corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo)

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó una re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF, con títulos máximos de hasta 1:8000, como se muestra en la figura 4.

Después del inicio de la Vacunación el paciente ha mostrado una estabilización de la enfermedad hasta el mes 19.

Ejemplo 4: Esquema de inmunización con Vacuna EGF utilizando Montanide ISA 51 como adyuvante y un tratamiento anterior a la vacunación con baja dosis de ciclofosfamida en pacientes con cáncer.

Con el objetivo de demostrar la inmunogenicidad y seguridad de la Vacunación con EGF, usando P64 como proteína transportadora y Alúmina como adyuvante, después de un pre-tratamiento con ciclofosfamida en baja dosis, se realizó un ensayo clínico en el que se inmunizaron 10 pacientes.

El paciente 4.1, JPG, fue incluido en el ensayo con diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón, células no pequeñas, enfermedad en progresión considerándose no elegible para ningún otro tratamiento onco-específico.

Se trató con una dosis de 100 mg/kg peso corporal de Ciclofosfamida, 3 días antes de ser inmunizado con la Vacuna EGF, con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF en un volumen total de 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide ISA 51 inmediatamente antes de su administración, en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

Se realizaron extracciones de sangre para determinaciones de bioquímica sanguínea y títulos de anticuerpos específicos contra el EGF en los días 0, 15, 30, 45, 60 y después mensualmente.

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo).

Al detectarse una caída en los títulos de anticuerpos, se realizó un re-inmunización con igual dosis de vacuna.

El paciente desarrolló una respuesta de anticuerpos anti-EGF con títulos máximos de hasta 1:400000, como se muestra en la figura 5.

Después del inicio de la Vacunación el paciente mostró una estabilización de la enfermedad hasta el mes 6

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con estabilización de la enfermedad en pacientes con cáncer.

En un ensayo Clínico Fase I, 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, fueron tratados con un esquema consistente en la administración de 5 dosis iniciales de la composición vacunal conteniendo 50ug de EGF y 2 mg de alúmina, administradas en los días 1, 7, 14, 21 y 51.

En el mismo ensayo otros 10 pacientes de Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) en estadios III y IV, se inmunizaron con un esquema consistente en la administración de 5 dosis de la composición vacunal conteniendo 50 ug de EGF, en un volumen total de entre 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con igual volumen de Montanide

Los títulos de anticuerpos se midieron mediante un ensayo ELISA, evaluándose como resultado de título de anticuerpos el valor de máxima dilución de suero que da un resultado positivo en el ensayo ELISA (valores de D.O por encima del doble de la media de los blancos del ensayo).

En el referido ensayo el 50% de los pacientes desarrollaron una respuesta de anticuerpos con títulos de 1:4000 o mayores (grupo GAR). En el otro 50% de los pacientes los títulos alcanzados fueron menores de 1:4000 (grupo BAR).

Del grupo GAR, el 87.5% mostraron una estabilización clínica y radiológica de la enfermedad igual o mayor a 3 meses, después de iniciado el tratamiento.

Del grupo BAR solo el 11.1% de los pacientes mostraron una estabilización clínica o y radiológica igual o mayor a 3 meses (tabla 1).

Estos datos demuestran la relación existente entre los niveles de respuesta de anticuerpos anti-EGF y la estabilización tumoral.

Tabla 1: Relación de respuesta de anticuerpos y estabilización clínica y radiológica de la enfermedad.

	% de pacientes	Estabilización de al menos 3 meses, % de pacientes
GAR	50%	87.5%
BAR	50%	11.1%

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de la vacunación con EGF y relación con la sobrevida de pacientes con cáncer sometidos a dicho tratamiento.

Cuarenta pacientes de NSCLC, estadios III y IV, fueron tratados en grupos de 10 con los esquemas detallados en los ejemplos 1,2,3 y 4.

Fueron caracterizados como GAR y BAR según los criterios expuestos en el ejemplo 6.

Del total de pacientes tratados en todos los esquemas, el 50% resultó ser GAR y el 50% BAR.

Al hacer una comparación de las sobrevidas alcanzadas por los pacientes GAR con las alcanzadas por los pacientes BAR, resultó haber una diferencia estadísticamente significativa, con una mediana de sobrevida (SV) para GAR de 9.1 meses, y una mediana de SV para BAR de 4.5 meses ($p < 0.02$). Este resultado puede observarse en la figura 6.

Ejemplo 7: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente RML, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de base de lengua, etapa IV fue incluido en el ensayo clínico de uso combinado del AMC IOR-R3 y radioterapia (RTP). Recibió 6 veces la dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal. La dosis acumulada del AMC fue de 1200mg y la dosis radiante fue de 60 Gy.

Al terminar la terapia combinada el paciente evidenció remisión completa del tumor primario y sus metástasis (figura 7). Esta respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

Ejemplo 8: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente EPG, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de amígdala con adenopatías cervicales, etapa III, fue incluido en el ensayo de tratamiento combinado del hR3 y RTP. Recibió 200 mg del AMC, con frecuencia semanal, durante 6 semanas, y una dosis radiante de 64 Gy.

Al finalizar el tratamiento, este paciente mostró remisión completa de la lesión tumoral (figura 8) y la respuesta se mantuvo por más de 13 meses.

Ejemplo 9: Efecto terapéutico de la combinación de Radioterapia y del AMC IOR-R3:

El paciente CHA, diagnosticado como portador de tumor de amígdala, en etapa IV, con adenopatías cervicales bilaterales fue incluido en el ensayo de tratamiento combinado del hR3 y RTP. Recibió dosis de 400 mg con frecuencia semanal, durante 6 semanas, para una dosis acumulada de 2400 mg. Concurrentemente recibió una dosis radiante de 64 Gy. Al finalizar el tratamiento este paciente se encontraba en remisión completa del tumor primario y las metástasis loco-regionales (figura 9). Esta respuesta se mantiene por 12 meses.

Ejemplo 10: Evaluación de combinación de terapia pasiva con anticuerpo anti-EGF-R (IOR-R3) y anticuerpo monoclonal anti-ligando del EGF-R (EGF-1) en ratones atímicos.

Evaluación de efecto anti-tumoral en relación con las dosis administradas. Este experimento simula además el posible efecto de la administración combinada del AMC anti-EGF-R y la Vacuna EGF, ya que esta última provoca una respuesta de anticuerpos anti-EGF que ejerce el mismo efecto que la administración pasiva de anticuerpos monoclonales con esa especificidad, con la ventaja adicional que la respuesta de anticuerpos lograda por vacunación puede ser mantenida en el tiempo, como se puede observar en los ejemplos 1, 2, 3 y 4, en los que se demuestra la cinética de títulos de anticuerpos en pacientes inmunizados con dicha vacuna.

Siete diferentes grupos de ratones atímicos de fondo genético NMRI (población abierta), fueron inmunizados con :

Grupo 1: 10 dosis de 0.5 mg del AMC EGF-1, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 2: 10 dosis de 1 mg AMC EGF-1, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 3: 10 dosis de 0.5 mg del AMC IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 4: 10 dosis de 1 mg del AMC IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria.

Grupo 5: 10 dosis de PBS, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria (control negativo).

Grupo 6: 10 dosis de la combinación de 0.5 mg de EGF-1 y 0.5 mg de IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria

Grupo 7: 10 dosis de la combinación de 1 mg de EGF-1 y 1 mg de IOR-R3, por vía intraperitoneal y con frecuencia diaria

El mismo día del inicio del tratamiento se les trasplanta 1×10^6 células de la línea tumoral humana H125, que sobre-expresa el EGF-R.

Las figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos. Se produce una potenciación del efecto anti-tumoral al combinar ambos tratamientos, y el mismo se hace mayor al aumentar las dosis aplicadas.

Ejemplo 11: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF en paciente con tumor en estadio avanzado:

El paciente ARP, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, recibió un tratamiento combinado secuencial de AMC IOR-R3 y Vacuna EGF.

Recibió 6 dosis de 200 mg del AMC, con frecuencia semanal, durante 6 semanas, conjuntamente con 30 dosis de radioterapia, 5 dosis por semana por 6 semanas, para una dosis radiante acumulada de 60 Gy.

Al finalizar el tratamiento estaba en remisión completa del tumor primario.

Un mes después de finalizado el tratamiento con el AMC, se inició un esquema de inmunización con la Vacuna EGF.

Recibió 5 dosis de 50 ug de EGF conjugado a P64, en un volumen total de 0.6 mls, mezclado hasta emulsificación con 0.6 ml de Montanide ISA 51 en el momento de la inmunización. Las inmunizaciones se realizaron en los días 1,7,14,21 y 51.

El paciente se mantiene en seguimiento.

Ejemplo 12: Esquema de tratamiento combinado AMC IOR-R3/ Vacuna EGF como terapia adyuvante:

El paciente MRM, diagnosticado como portador de carcinoma epidermoide de pulmón, fue sometido a intervención quirúrgica.

Un mes después del acto quirúrgico, el paciente inició un tratamiento combinado simultaneando la inmunoterapia pasiva con el AMC IOR-R3 y la vacuna EGF. En la (figura 12) se detalla el esquema de intervalos de dosificación del tratamiento recibido.

El paciente se encuentra en seguimiento.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS:

Figura 1: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en paciente MMG, inmunizado según se detalla en el ejemplo 1. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 2: Cinética de respuesta de anticuerpos del paciente AMC, inmunizado según se detalla en el ejemplo 2. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 3: Regresión tumoral observada en el paciente AMC. En la imagen de la izquierda se observa masa tumoral existente al inicio del tratamiento. En la imagen de la derecha se observa que a los 12 meses de iniciado dicho tratamiento la masa tumoral había desaparecido.

Figura 4: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF en el paciente FNR, inmunizado según se detalla en el ejemplo 3. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 5: Cinética de respuesta de anticuerpos anti-EGF del paciente JPG, inmunizado según se detalla en el ejemplo 4. Las flechas indican tiempos en que se realizaron re-inmunizaciones.

Figura 6: La figura muestra las curvas Kaplan Meyer de los grupos de pacientes con altas respuestas anti-EGF (GAR) y con bajas respuestas anti-EGF (BAR), así como la de un grupo control histórico.

Puede observarse que los GAR presentan un incremento de sobrevida significativo comparados tanto con GAR como con los controles históricos.

Figura 7: Demostración gráfica de remisión del tumor en paciente RML, tratado como se detalla en ejemplo 7.

Figura 8: Demostración gráfica de regresión tumoral en paciente EPG tratado según se detalla en el ejemplo 8.

Figura 9: Demostración gráfica del tumor en paciente CHA, tratado como se detalla en el ejemplo 9.

Figura 10: Grupos de ratones inmunizados con 0.5 mg de cada uno de los AMC IOR-R3, EGF-1, y con la combinación de 0.5 mg de IOR-R3 + 0.5 mg de EGF1, como se detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.

Figura 11: Grupos de ratones inmunizados con 1mg de cada uno de los AMC IOR-R3 , EGF-1, y con la combinación de 1 mg de IOR-R3 + 1 mg de EGF1, como se detalla en el ejemplo 10. Se observa un efecto sinérgico de disminución del crecimiento tumoral en el grupo tratado con la combinación de ambos AMC.

Figura 12: Tratamiento combinado conjunto del AMC IOR-R3 y la Vacuna EGF:
Las flechas por encima del eje de tiempo significan las fechas de administración del AMC (días 1,7,14,21,28 y 35) y las flechas por debajo del eje de tiempo significan los tiempos de las inmunizaciones con la Vacuna EGF (días 2,8,15,22,y 52).



Josefa Lombardero Valladares

Representante Legal

Centro de Inmunología Molecular

REIVINDICACIONES:

1. Una combinación útil para la inmunoterapia, donde dicha combinación tiene efecto sobre el crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente de la interacción entre un receptor y su ligando en el sistema de receptores proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK), dicha combinación comprende:
 - a.- Un anticuerpo contra un receptor RTK.
 - b.- Una vacuna cuyo principio activo sea el receptor de RTK, que induce anticuerpos contra dicho receptor RTK.
2. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 1 donde dicho receptor RTK es el receptor del EGF.
3. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 2 donde la vacuna sea contra el receptor del EGF.
4. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 2 donde el anticuerpo contra el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor del EGF.
5. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 4 donde el anticuerpo contra el receptor RTK es un anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF.
6. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 5 donde el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF es hR3.
7. Una combinación útil para la inmunoterapia, donde dicha combinación tiene efecto sobre el crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente de la interacción entre un receptor y su ligando en el sistema de receptores proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK), dicha combinación comprende:
 - a.- Un anticuerpo contra el(los) ligando(s) del receptor RTK y
 - b.- Una vacuna cuyo principio activo es(sean) el(los) ligando(s) del receptor RTK y que induce anticuerpos contra dicho(s) ligando(s).
8. La combinación terapéutica según reivindicación 7 donde el ligando del receptor RTK es el EGF.
9. La combinación terapéutica según reivindicación 8 donde dicha vacuna comprende un conjugado entre las proteínas p64K y EGF.
10. La combinación terapéutica según reivindicación 7 donde el ligando del receptor RTK es el TGF α .
11. La combinación terapéutica según reivindicación 10 donde dicha vacuna comprende un conjugado entre las proteínas p64K y TGF α .
12. Una combinación útil para la inmunoterapia, donde dicha combinación tiene efecto sobre el crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente de la interacción entre un receptor y su ligando en el sistema de receptores proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK), dicha combinación comprende:
 - a.- Un primer agente seleccionado de uno de los anticuerpos contra el receptor RTK y de una vacuna donde el principio activo es el receptor RTK que induce anticuerpos contra dicho receptor RTK, y
 - b.- Un segundo agente seleccionado de uno de los anticuerpos contra el ligando del receptor RTK y de una vacuna donde el principio activo es dicho ligando, que induce anticuerpos contra dicho ligando.
13. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 12, donde el primer agente es un anticuerpo contra el receptor RTK.

14. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 13 donde el anticuerpo contra el receptor RTK es un anticuerpo contra el receptor de EGF.
15. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 14 donde el anticuerpo contra el receptor de EGF es un anticuerpo monoclonal.
16. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 15 donde el anticuerpo contra el receptor de EGF es un anticuerpo humanizado.
17. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 16 donde el anticuerpo contra el receptor de EGF es hR3.
18. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 12, donde el primer agente es una vacuna cuyo principio activo es un receptor RTK.
19. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 18, donde el primer agente es una vacuna cuyo principio activo es el receptor de EGF.
20. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 12 donde el segundo agente es un anticuerpo contra el ligando del receptor RTK.
21. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 20 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el EGF.
22. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 20 donde el anticuerpo contra el ligando del receptor RTK es un anticuerpo contra el TGF α .
23. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 12, donde el segundo agente es una vacuna cuyo principio activo es un ligando de receptor RTK.
24. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 23 donde la vacuna contiene como principio activo el EGF.
25. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 24 donde la vacuna contiene como principio activo un conjugado entre las proteínas p64K y el EGF.
26. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 23 donde la vacuna contiene como principio activo el TGF α .
27. La combinación inmunoterapéutica según reivindicaciones 1-26 cuya combinación consiste en un juego de reactivos que contiene dosis independientes de formulaciones efectivas tanto de anticuerpos como de vacunas y donde la combinación de dichas formulaciones independientes produce un arresto del crecimiento de tumores dependientes de RTK.
28. La combinación inmunoterapéutica según reivindicación 27, cuya combinación consiste en un juego de reactivos que contiene dosis independientes de formulaciones efectivas tanto de anticuerpos contra el receptor de EGF y sus ligandos, como de la vacunas cuyo principio activo es el receptor de EGF y sus ligandos (EGF, TGF α), y donde la combinación de dichas formulaciones independientes produce un arresto del crecimiento de tumores que sobre-expresan el receptor de EGF.
29. Un método para controlar el crecimiento y/o proliferación de células cuyo crecimiento es dependiente de la interacción entre un receptor y su ligando en el sistema de receptores proteínas quinasas en residuos de tirosina (RTK), dicho método comprende el tratamiento con una de las combinaciones terapéuticas definidas en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
30. Un método según reivindicación 29 que comprende el tratamiento simultáneo con agentes contra receptores RTK y sus ligandos.
31. Un método según reivindicación 29 que comprende el tratamiento simultáneo con vacunas y anticuerpos.

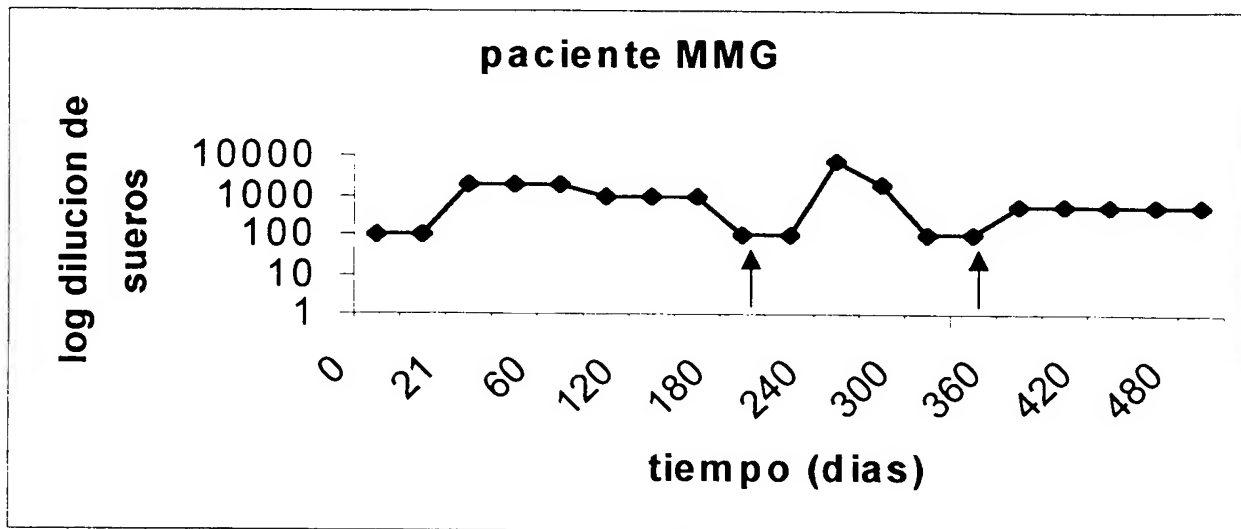
32. Un método según reivindicación 29 que comprende el tratamiento en una primera etapa con dicho anticuerpo y en una segunda etapa con dicha vacuna.
33. Un método según reivindicación 29 que comprende el tratamiento en una primera etapa con dicha vacuna y en una segunda etapa con dicho anticuerpo.



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

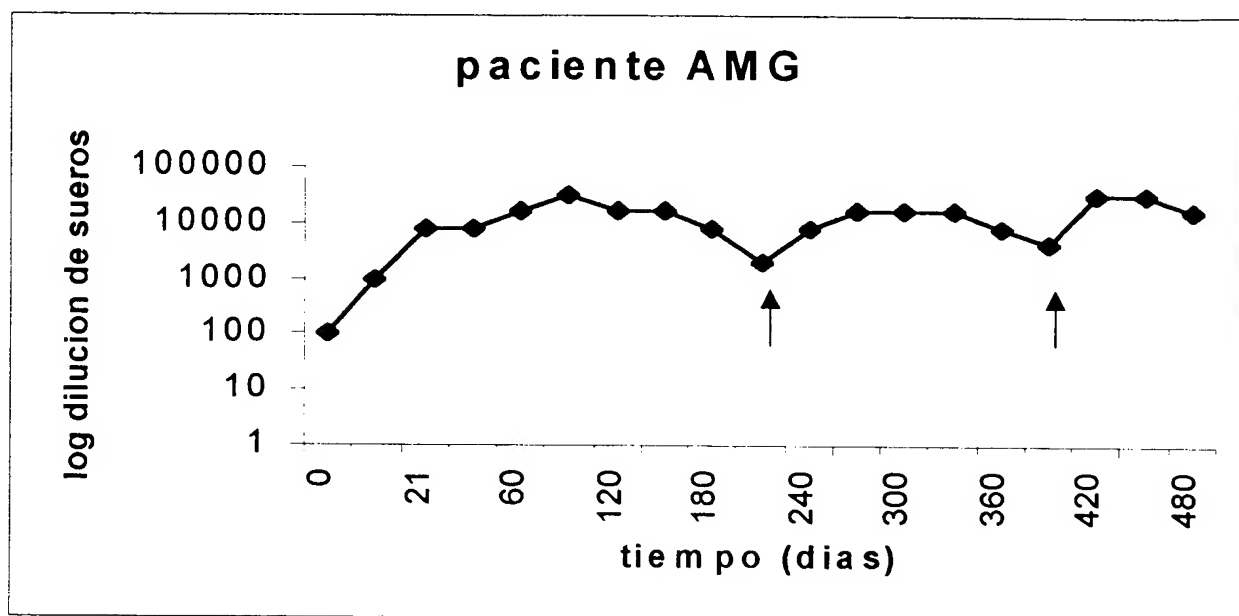
FIGURAS:

Figura 1:



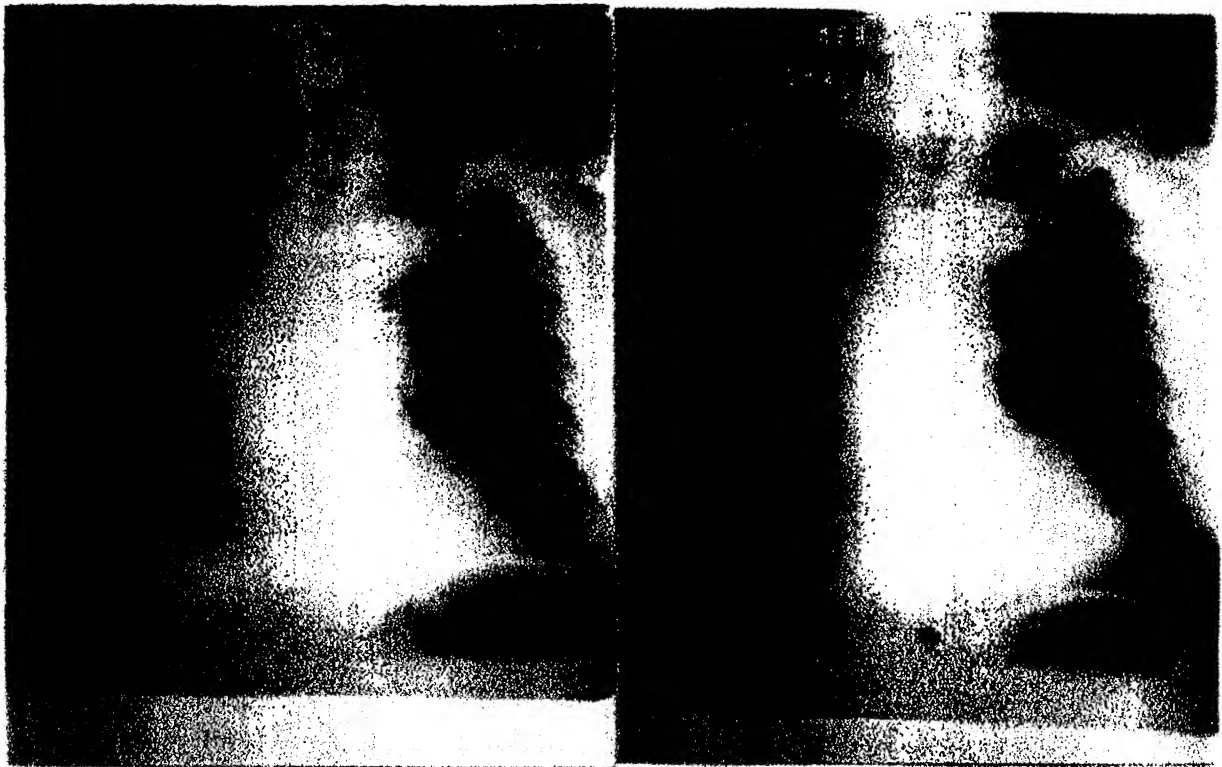
Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 2:



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

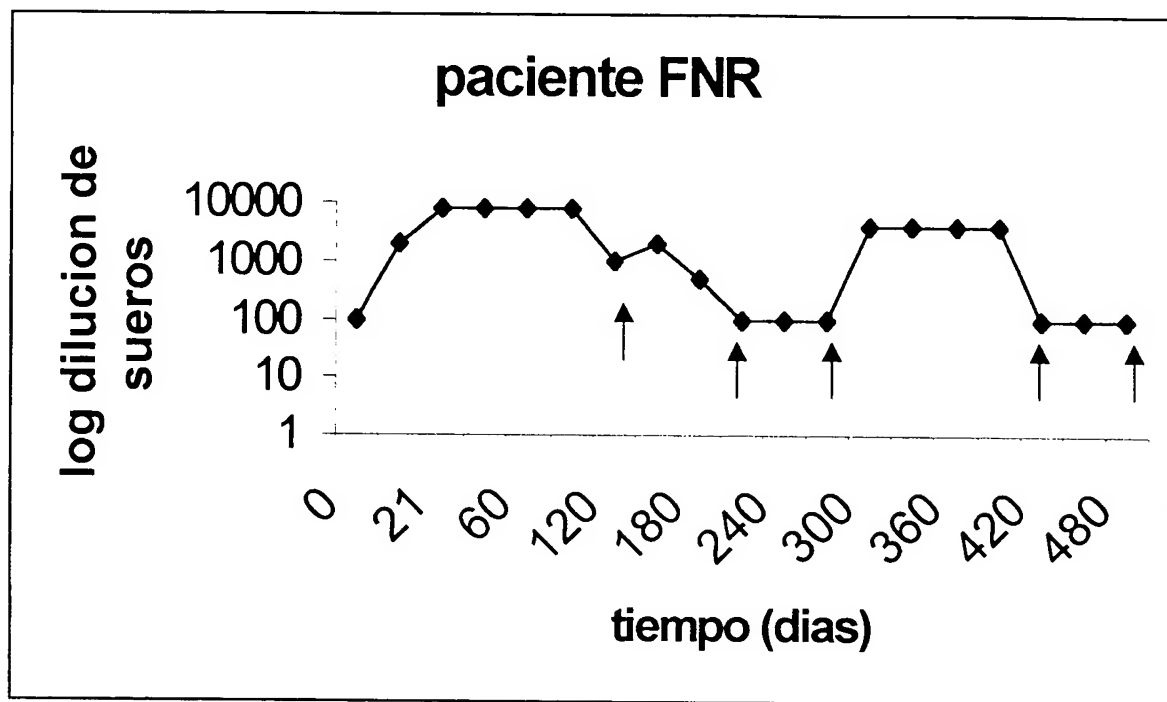
Figura 3:



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized, cursive letter 'J' followed by a loop and a vertical line extending downwards.

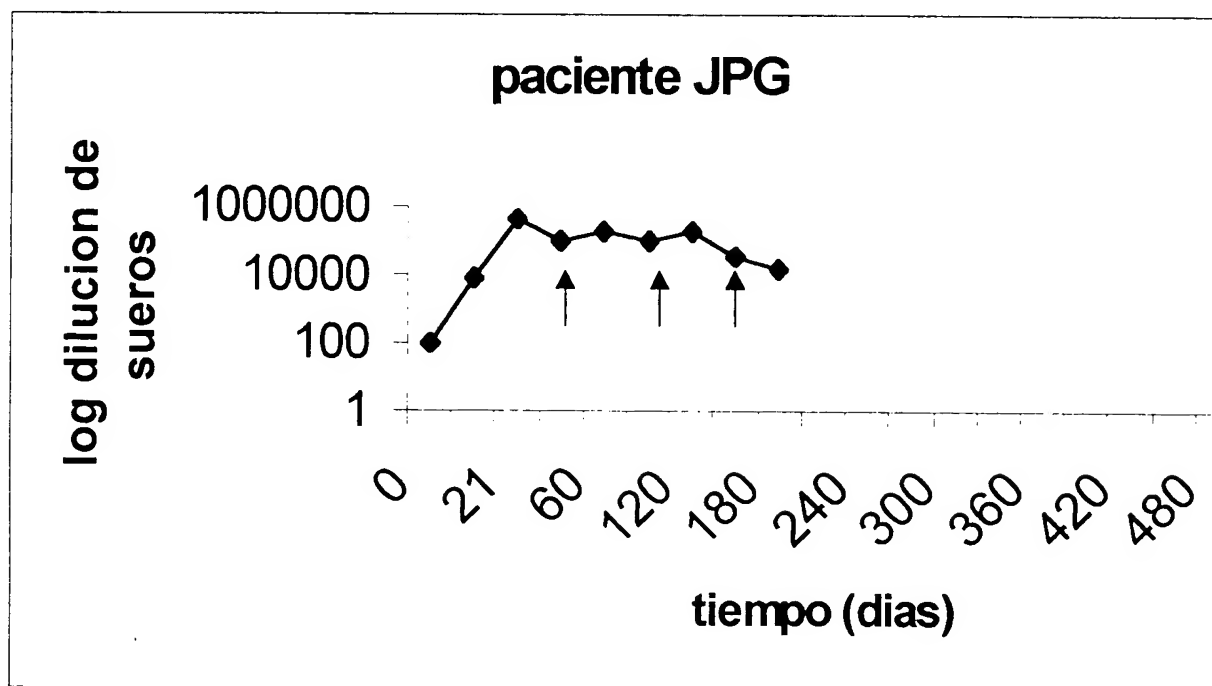
Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 4 :



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

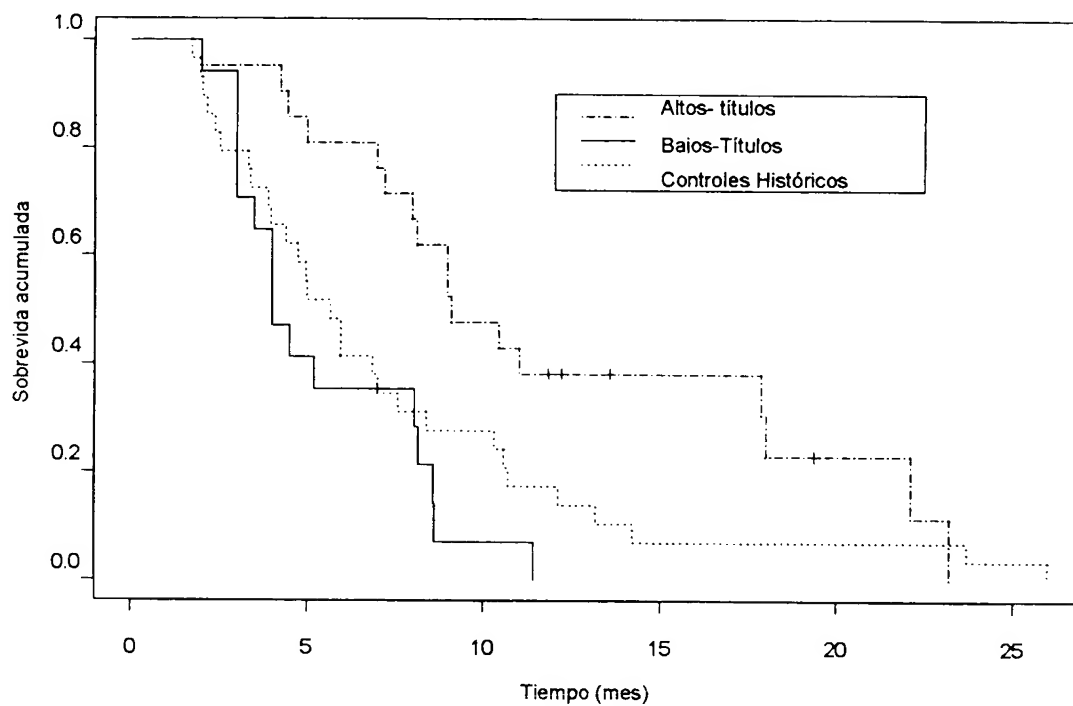
Figura 5:



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 6:

Sobrevida de los pacientes con altos y bajos títulos vs EGF(2 ensayos)





Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 7

**Iniciales del paciente: RML
RTP + h-R3 (200 mg)**

Antes: Tumor (Base de lengua)



Después: Remisión completa



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal

Figura 8

Iniciales del paciente: EPG
RTP + h-R3 (200 mg)

Tumor (amígdala)

Remisión completa



Antes



Después

JP

Josefa Lombardero Valladares

Figura 9

Iniciales del paciente: CHA

RTP + h-R3 (400 mg) (antes del tratamiento)

Tumor de amígdala



nódulo cervical



[Handwritten signature]

Josefa Lombardero Valladares



**Después del tratamiento (remisión completa del tu
nódulo cervical)**

[Handwritten signature]

Josefa Lombardero Valladares

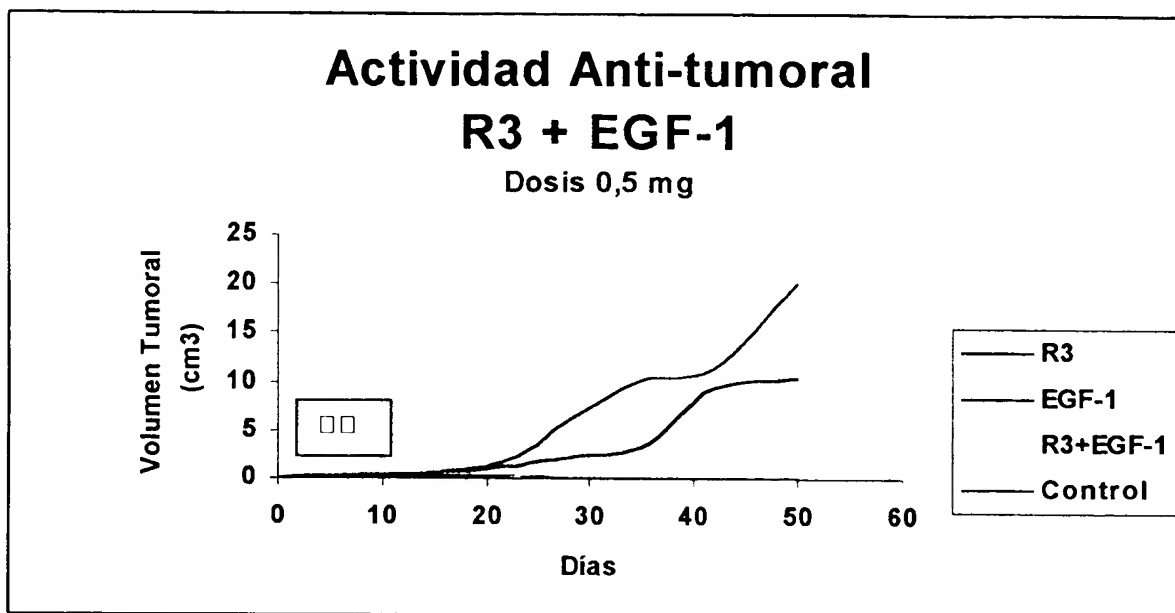
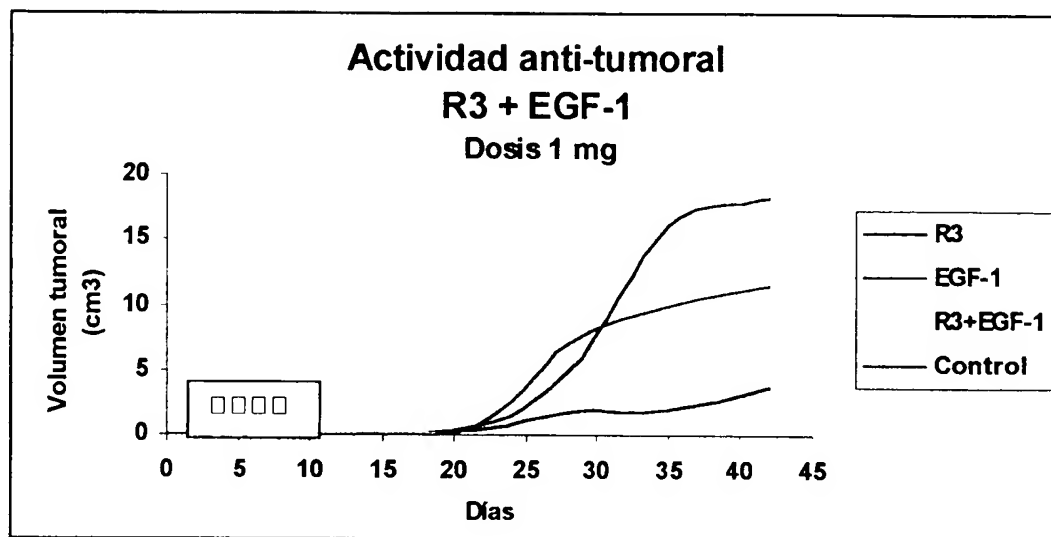


Figura 10: □□□□□□□□□□

Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 11: □□□□□□□□




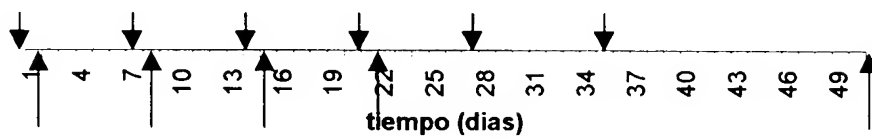

Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular

Figura 12:



Josefa Lombardero Valladares
Representante Legal
Centro de Inmunología Molecular